

MINISTERE DE L'AGRICULTURE
INRA
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

PERTURBATIONS BIOCHIMIQUES OBSERVEES
EN RELATION AVEC L'APPARITION D'UN
"PHENOMENE AEROSPATIAL NON-IDENTIFIE"
CHEZ UNE LUZERNE SAUVAGE

PERTURBATIONS BIOCHIMIQUES OBSERVÉES
EN RELATION AVEC L'APPARITION D'UN
"PHÉNOMÈNE AÉROSPATIAL NON IDENTIFIÉ"
CHEZ UNE LUZERNE SAUVAGE (Medicago minima)*

M B
Docteur ès Sciences

INTRODUCTION

Un objet non identifié a été observé le 8-1-81 vers 17h à
. Un téléx de la Gendarmerie de
appelée pour enquête, résume la déposition du témoin ainsi que les
premières constatations : l'objet, ovoïde de 3m de diamètre, environ,
émettait un léger sifflement à la verticale du jardin du témoin
puis est descendu jusqu'à 1m du sol environ : lorsque le témoin
s'est approché, l'objet est remonté rapidement à la verticale,
s'est stabilisé à environ 25m de hauteur puis a suivi une
trajectoire vers l'Est. Une trace visible circulaire a pu être observée
au niveau du sol, à l'aplomb du lieu de survol : cette trace
comporte deux arcs « ressemblant à des traces de ripages de
pneumatiques : long 40cm x large 10cm chacune » (P.V. N° 28 du 9-1-81).

* Déterminée grâce au concours de M.C

Prélèvements -

Deux séries de prélèvements ont été effectuées successivement :

a) Par la Gendarmerie de

- le 12-1-81 dans l'une des traces ($1m^{10}_0$ du centre) (donc J+4)
- le 23-1-81 à 20 m de la trace, au titre de témoin (J+15)

b) Par le GEPAN : le 17-2-81 (J+40)

- les prélèvements sont effectués à partir du centre, sur la périphérie, et à des distances croissant jusqu'à 10 m du centre (fig.1)

Présentation des Echantillons •

- 1^{ère} Série - Echantillons recueillis en sachets de papier et parvenus à l'état desséchés -

Les lots "exposés" ($1m^{10}_0$ du centre, sur les traces dites "de ripage") montrent un pivot racinaire duquel partent des faisceaux de tiges encore vertes à la base mais desséchées et brisées à leur extrémité (fig 2A). Quelques jeunes pousses subsistent par endroit au bas des ramoux (fig 2B) et des feuilles âgées se trouvaient éparpillées dans les prélèvements, souvent endommagés par artefacts mécaniques sans doute postérieurs à l'événement (sachets plus ou moins écrasés durant le transport, par exemple) (fig 2-C).

Les lots "témoins" pris à 20 m montrent un aspect plus vivace, avec davantage de feuilles intactes, jeunes (fig 2-E) et âgées (fig 2-F). (fig. 2-D)

- 2^{ème} série - Les plants ont été reçus au laboratoire, à l'état frais, quelques heures seulement après leur prélèvement. Les échantillons provenant du centre de la trace présentent un aspect rappelant celui des échantillons de la 1^{ère} série. Toutefois, de jeunes pousses d'aspect normal (feuilles vertes de 3 à 4 mm de largeur totale) apparaissent à la base des plants.

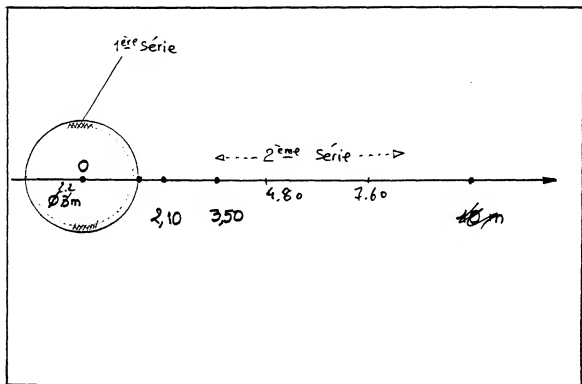


Figure 1. Disposition des prélèvements d'échantillons.

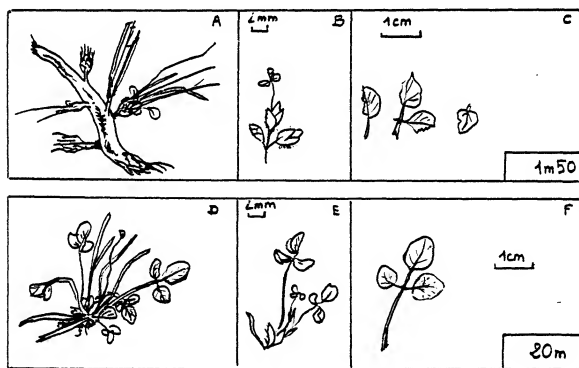


Fig. 2. Aspect des échantillons de la 1ère Série : A et D : faisceaux de tiges (A = exposées D = témoins) - B et E : Jeunes Feuilles ; C et F = Feuilles âgées.

Tous les autres prélèvements présentent un aspect vivace, très fourni en feuilles de tous les stades.

Sélection des Parties analysées

les deux critères ayant présidé au choix des fragments analysés sont les suivants :

- Identité morphologique (y compris la couleur) des échantillons homologues provenant des divers points de prélèvements -
- Répartition des éléments retenus pour analyse sur toute la surface des prélèvements -

Description des prélèvements analysés (d = distance du centre)

1^{ère} série : (regroupement de fragments morphologiquement semblables)

N4 = feuilles âgées (d=1,5m) : 103,78 mg sec }
 N11 = feuilles âgées (d=20m) : 96,14 mg sec } taille des feuilles
 15 à 20 mm

N8 = jeunes feuilles (d=1,5m) : 51,7 mg sec }
 N15 = jeunes feuilles (d=20m) : 25,14 mg sec } taille des feuilles
 3 à 4 mm

2^{ème} série : (entièrement constituée de jeunes feuilles) (taille 3 à 4 mm).

E-1 = 8 feuilles (d=0) 76,8 mg frais $\bar{P} = 9,6$ mg / feuille

E2 = 8 " (d=1,5m) 79,0 mg " $\bar{P} = 9,88$ mg "

E3 = 18 " (d=2,1m) 52,0 mg " $\bar{P} = 2,90$ mg "

E4 = 16 " (d=3,5m) 45,0 mg " $\bar{P} = 2,82$ mg "

E5 = 8 " (d=10m) 96,0 mg " $\bar{P} = 12,0$ mg "

E6 = 15 " (d=10m) 73 mg " $\bar{P} = 4,87$ mg "

...

Les échantillons E-5 et E-6 encadrent les valeurs des poids moyens individuels de l'échantillon E-1. La comparaison entre E5 et E6 pourra en outre rendre compte des effets éventuels imputables à la croissance des jeunes feuilles (au cas où E3 et E4, par exemple, présenteraient des anomalies inhérentes à leur moindre développement, liées aux hasards de la distribution éco-physiologique).

Relation Poids Frais / Poids sec

Deux lots de 5 feuilles de la 2^e série ont été desséchés à l'étuve (6 heures à 100°C) : le poids sec final représentant alors $28,5 \pm 1,0$ % du poids frais.

TABLE DES ANALYSES

I. Fraction Lipo-soluble :

Pigments chlorophylliens et dérivés

Pigments caroténoïdes

Co-Facteurs photosynthétiques

Lipides apolaires (ac. gras et glycérides, stéroïdes etc.)

II. Fraction Hydro-soluble :

Glucides libres

Amino-acides libres

Enzymes : Phosphatases alcalines (localisation chloroplastique)
+ divers essais.

EXTRACTIONS

a) Les composants liposolubles sont extraits en premier lieu par le mélange chloroforme-méthanol (85-15 v/v) à raison de 3 fois $2 \mu\text{l}$ par mg de poids frais (BOUNIAS, 1981 - ANALYSIS, sous presse). Cette technique remplace avantageusement les précédentes utilisant l'éther diéthylique et l'éther de pétrole (BOUNIAS, 1969 - CHIMIE ANALYTIQUE, 51, 76-82).

Les surnageants de centrifugation (après 10 mn à 5000g) sont regroupés et concentrés sous pression réduite jusqu'à la valeur de 0,5 mg de tissus frais par μl d'extrait.

Toutes ces opérations sont effectuées dans la pénombre (dim light) et les extraits sont conservés à -24°C avant d'être chromatographiés.

b) Les composants hydrosolubles sont extraits à l'aide d'un mélange éthanol-eau-pyridine-acide acétique (75-15-10-5 v/v) à raison de 2 fois $1,5 \mu\text{l}$ par mg de tissus frais. Les extraits sont regroupés et concentrés sous pression réduite puis ajustés à 0,5 mg de tissus par μl d'extrait.

Dans les deux cas a) et b), les tissus sont maintenus dans le même instrument de broyage (micro-Potter) et soumis successivement aux deux séries d'extractions sans opérations intermédiaires de transvasements - Tous les transferts de volumes sont opérés à l'aide de microseringues Hamilton.

CHROMATOGRAPHIES

Les analyses chromatographiques sont décrites en totalité dans un ouvrage en cours d'édition (BOUNIAS, 1981-82 : L'analyse biochimique quantitative à l'échelle de la nanomole par chromatographie en couche mince sur supports souples) et pour une part dans les publications suivantes du même auteur : *Analisis* 4 (1976), 87-93 ; *Analisis* 8 (1980), 287-295 ; *Analisis* 9 (1981) sous presse ; *Chimie Analytique* 51 (1969), 76-82 ; *Analytical Biochemistry* 106 (1980), 291-295 ; Thèse Doct. Etat Es Sc. 1972 (N°98) 262 p., 145 tableaux num., 47 fig., 10 planches photog. microsc., 255 réf. bibl. .

Les dépôts (prises d'essai) sont de 2 μ l (soit 1 mg de poids frais) pour les composants lipo-solubles et de 1 μ l (soit 0,5 mg de poids frais) pour les composants hydro-solubles -

ANALYSES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES

Les composés séparés sur plaques chromatographiques peuvent être caractérisés in situ par leur spectre d'absorption atomique selon le même principe qu'en phase liquide, dans un solvant. C'est le support des plaques qui joue ici le rôle du solvant. Cette technique directe évite les artefacts et pertes qui accompagnent l'élution des substances. Son application, déjà illustrée en 1969 (*Chimie Analytique*, 51, 76-82) a pu être développée au cours du dernier trimestre 1981 grâce à l'acquisition d'un spectro-photo-densitomètre (SHIMADZU CS 920)

Première Partie

PIGMENTS ET CO-FACTEURS PHOTOSYNTHÉTIQUES

Chapitre I

PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS ET CAROTÉNOÏDES

A. TECHNIQUES.

Plaques chromatographiques : Gel de Silice 60 - Merck Réf. 5748

Eluants :

Série 1 : Benzène - dichlorométhane - acétone - méthanol (50-50-5-5) (81-30)

Benzène - acétone - méthanol (30-5-5) (81-29)

(90-5-5) (81-36) (81-39)

(65-7-3) (81-40)

Série 2 : Benzène - dichlorométhane - acétone - méthanol (44-30-4-2) (81-27)

Benzène - acétone - méthanol (65-2-5) (81-35)

Benzène - méthanol (50-5) (81-28)

(65-5) (81-29bis)

Etalons (pigments du Bleu) :

• Benzène - acétone - méthanol (60-5-5) (81-332)

• " " " (70-5-5) (81-333)

• Benzène - méthanol (65-5) (81-331)

B. RÉSULTATS

① Etalonnages.

Le dosage des pigments étalons extraits du B6 a été effectué par analyse spectrophotométrique dans l'acétone à 80%, aux longueurs d'ondes: $\lambda = 440; 645; 663 \text{ nm}$ (COMAR & ZSCHEILE) in: LEFORT, Rev. Cytol. Biol. Veg., 1959, 22, 1-160.
 $\lambda = 649; 665 \text{ nm}$ (GOTTSCALK & MULLER, 1964, Planta, 61, 259)
 (VERNON, 1950, Anal. Chem., 32, 1144)
 (MACKINNEY, 1941, J. Biol. Chem., 140, 315)

Un étalonnage (opéré en lumière blanche en raison des problèmes techniques dus à un photomètre partiellement défectueux) a été établi provisoirement, avec les paramètres suivants (cf. BOUNIAS, Analyt. Biochem. 1980)

Tableau 1

| Pigments | pende: $\text{n mole} \cdot \text{cm}^{-2\%}$ | coefficient d'expansion linéaire α |
|------------------|---|---|
| Chlorophylle (a) | 0,55 | 1,20 |
| Chlorophylle (b) | 0,42 | 1,30 |
| β Carotène | 0,29 | 1,00 |
| Lutéine | 0,55 | 1,20 |
| Violaxanthine | 1,40 | 1,10 |
| Néoxanthine | 1,25 | 1,00 |

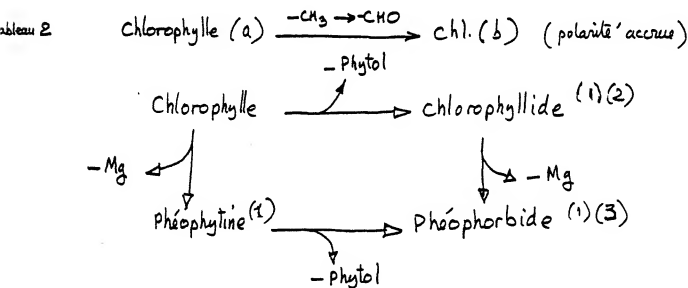
Ces données ont permis d'opérer une quantification des résultats en valeurs absolues (nmoles par mg de tissus frais). Les valeurs pourront être affinées par la suite à l'aide de simples coefficients de proportionnalité, mais les études comparatives restent évidemment valables pour l'ensemble des échantillons analysés.

② Résultats portant sur la 1^{ère} série

Quatre groupes d'analyses ont été successivement effectués^(*), avec des résultats concordants. Le dépouillement des données numériques est encore incomplet à l'heure actuelle et les paramètres statistiques définitifs ne seront indiqués qu'ultérieurement. Pour les résultats partiels figurant dans ce rapport, les coefficients de variation s'établissent à $C = \frac{O\%}{\bar{x}} = 0,22$ pour $N=3$ mesures.

La figure 3 montre un chromatogramme-type. Les différents composés se séparent depuis la ligne de départ (D, à gauche) dans l'ordre des propriétés des polarités moléculaires décroissantes.

Rappelons quelques données structurales élémentaires (cf. VERNON & SEELY, 1966 - "The Chlorophylls" - Acad. Press, 679 p.)



- { La perte du noyau Magnésium abaisse la polarité des molécules.
- { La perte du radical Phytyle augmente fortement la polarité.

(1) FISHER & STERN - 1940 - Die Chemie des Pyrrols - Vol. 2 - Part II - Akadem. Verlagsges. - Leipzig
 (2) STRAIN & MANNING, 1942 - J. Biol. Chem., 146, 275.
 (3) PENNINGTON et al., 1964 - J. Am. Chem. Soc., 86, 1418.

(*) RÉF. 29-36.39-40

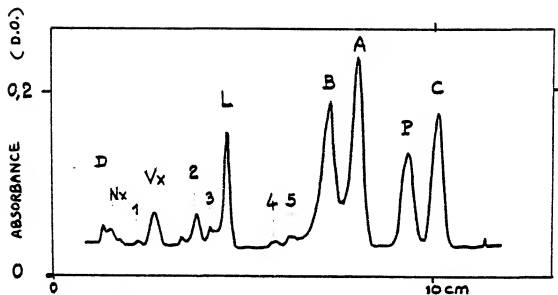


Fig. 3 Chromatogramme d'extrait pigmentaire de la 1^{ère} Série

(Phase chloroforme - Sans révélation -
Photomètre Vernon PHi-5 - Lum. blanche) Rét. 81-29

C = β carotène (+ α)

P = Pheophytines

A = chlorophylle A

B = chlorophylle B

L = Lutéine

Vx = Violaxanthine

Nx = Néoxanthine

D = Dépôt (chlorophyllides + "tannins")
+ Pheophorbides)

1 = Méthyl-chlorophyllides.

2 = Protochlorophyllides

3 = type Lutéine-époxyde ou
Zéaxanthine

4 = type cryptoxanthine ou Carotène-époxyde

5 = Oxy-chlorophylles

Les composés séparés sont caractérisés par leur mobilité chromatographique, l'ordre restant sensiblement constant quel que soit le système utilisé (cf SCHNEIDER, 1969, Progress in Photosynthetic Research, Vol II, 552-554) ainsi que par leur spectre d'absorption.

La fig. 4 montre les spectres comparés des chlorophylles A et B d'après diverses méthodes expérimentales :

A₁B₁ - en solution dans l'éther (STRAIN, THOMAS & KATZ, 1963. BBA, 75, 306)

A₂-B₂ - en solution dans l'acétone à 80% (extraits d'Arabidopsis, BOUNIAS, 1969)

A₃-B₃ - Sur plaques de gel de silice

Quelques caractéristiques spectrales (en solution) sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3

| Pigments - | maxima ou (*)épaulements | Rapport $\frac{DO\ 428}{DO\ 660}$ |
|----------------------------|--------------------------|---|
| chlorophylle A | 428,5-430 / 660-662 | 1,20 à 1,32 (1) |
| chlorophylle B | 452-455 / 642-644 | 2,82 à 2,84 (1) |
| Phéophytine A | 409 / 667 | (1) (ZSCHEILE & CONAR, 1941, Bot. Gaz, 102, 463) (PENNINGTON, STRAIN, SVEC & KATZ, 1964. J. Am. Chem. Soc., 86, 1418.) |
| Protochlorophylle | 432/535/571 / 623 | |
| Me. Chlorophyllide A | 427,5 / 660,5 | |
| Me. Phéophorbide A | 408,5 / 667 | |
| β Carotène | 427* / 449 / 477 | (GOODWIN, 1980 - The biochemistry of carotenoids - Chapman and Hall - London / New York) |
| Lutéine-5-6-époxyde | - 443 / 472 | |
| Violaxanthine | 427 / 452 / 481 | |
| Néoxanthine | 418 / 442 / 467 | |
| Lutéine (dans le Méthanol) | 417,5 / 440 / 468 | (BOUNIAS, 1969) |

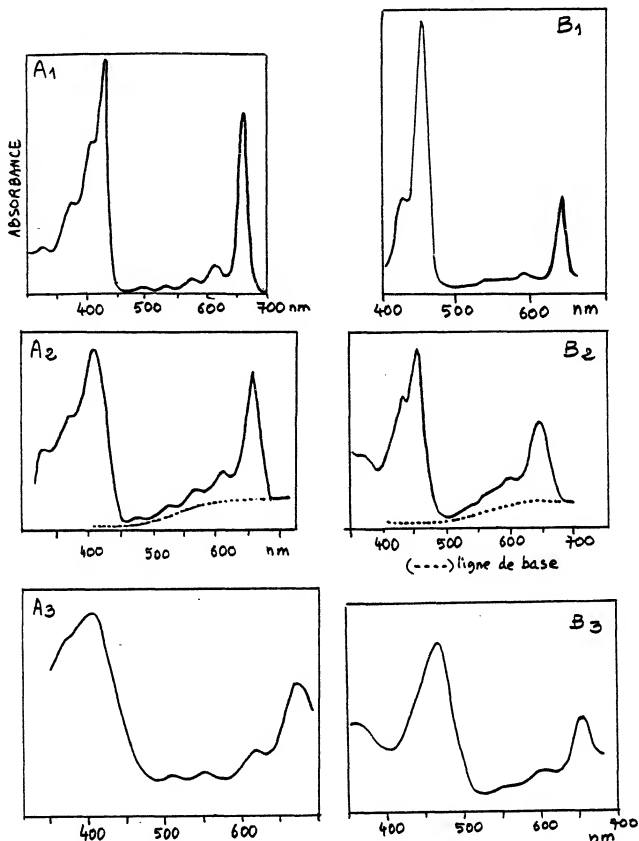


Fig. 4. Spectro photométrie comparée des chlorophylles

A1-B1, A2-B2 : en solution

A3-B3 : sur plaques.

L'identification des composants ne pose pas ici de problème particulier, et les données numériques correspondantes sont présentées dans le tableau suivant. (nmoles/mg)

Tableau 4

| Pigments | Echantillons : | | | |
|-----------------------------------|----------------|-------|------|------|
| | N-15 | N-8 | N-11 | N-4 |
| Chlorophylle A | 0,87 | 0,58 | 0,81 | 0,54 |
| Chlorophylle B | 0,62 | 0,45 | 0,51 | 0,37 |
| (A+B) | 1,49 | 1,03 | 1,32 | 0,91 |
| Phéophytine A | 0,73 | 0,44 | 0,29 | 0,20 |
| β Carotène | 0,21 | 0,09 | 0,20 | 0,10 |
| Lutéine | 0,32 | 0,28 | 0,34 | 0,24 |
| Violaxanthine | 0,15 | 0,030 | 0,17 | 0,11 |
| Néo-xanthine + chlorophyllides | 0,28 | 0,30 | 0,26 | 0,25 |
| Protochlorophyllide | — | — | 9,9 | 6,0 |

Les différences d'équipement pigmentaire inhérentes au vieillissement (abaissement des chlorophylles, augmentation des xanthophylles) déjà observées chez l'orge (BOUNIAS, thèse 1972) se retrouvent ici sans équivoque dans les échantillons prélevés à 20 m.

Les échantillons provenant de la périphérie ($d=1,5$ m) montrent un affaiblissement général des teneurs pigmentaires. Quel que soit l'âge des feuilles, les chl. A sont abaissés de 33%, les chl. B de 28% et la phéophytine de 31% : ces trois valeurs montrent une grande homogénéité.

Parmi les caroténoïdes, le plus affecté est le β carotène qui est abaissé de 50 à 57% au voisinage du "phénomène", ainsi que la violaxanthine (-80% chez les jeunes feuilles).

③. Résultats portant sur la 2^{ème} Série

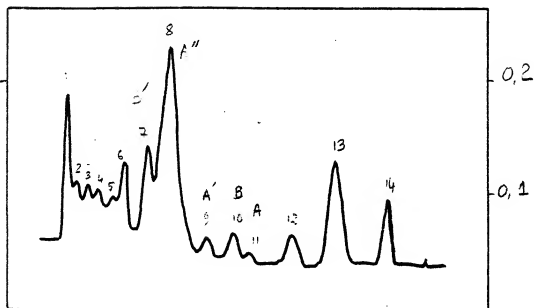
La première d'une série de 5 analyses chromatographiques (81-27) a fait apparaître diverses anomalies au niveau des chlorophylles, comme le montre la figure 5.

Les chlorophylles A et B sont distribuées sous plusieurs formes aux caractéristiques spectrales similaires (fig. 6) comme le confirmeront les analyses suivantes.

Plusieurs explications peuvent être proposées

- a) Certains dérivés considérés comme des isomères A', B' etc. des chlorophylles A, B etc. ont été identifiés depuis longtemps (MANNING & STRAIN, 1943, J. Biol. Chem., 151, 1) (BOOTH, 1962, Biochem. J., 84, 444) (BOOTH, 1965, Chromatog. Rev., 7, 98). Ces dérivés sont légèrement moins adsorbés que les formes d'origine
- b) Des formes dites "allomères", qui sont, en fait, des produits d'oxydation, conduisent à des dérivés légèrement plus adsorbés (car plus polaires) que les chl. A et B. Ces dérivés peuvent se former très rapidement (JOHNSTON & WATSON, 1956, J. Chem. Soc., p1203)
- c) Des formes oxydées de chl. B ont été décrites par STRAIN, 1955, J. Am. Chem. Soc., 77, 5195, mais également un autre dérivé plus adsorbé lui aussi, et considéré comme un isomère (FREED, SANCIER & SPORER, 1954, J. Am. Chem. Soc., 76, 6006).

Dans notre cas, il paraît vraisemblable que nous soyons en présence de formes oxydées A' et A'', ainsi que B'. Toutefois, seule la modification de la chl. A paraît irréversible : des analyses ultérieures ont prouvé que la forme B' pouvait se retrouver pour la plus grande part sous la forme initiale : B.



- | | |
|---|-------------------------|
| 1 - Chlorophyllides + Phéophorbides + Néoxanthine | |
| 2 - Violaxanthine | |
| 3-4 - Protochlorophyllides | |
| 5 - Protochlorophyllides résiduels + Zéaxanthine (ou Lutéine-époxyde) | |
| 6 - Lutéine | |
| 7 - Chlorophylle B' | |
| 8 - Chlorophylle A'' | |
| 9 - Chlorophylle A' | } 12 - Phéophytine A |
| 10 - Chlorophylle B | |
| 11 - Chlorophylle A | } 14 - β Carotène |

Fig 5. Chromatogramme des pigments
photosynthétiques de la 2^e série
(Réf. 81-27)

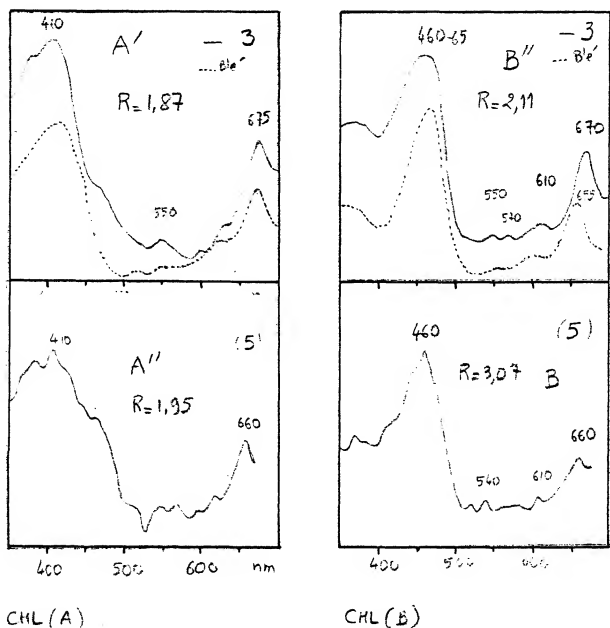
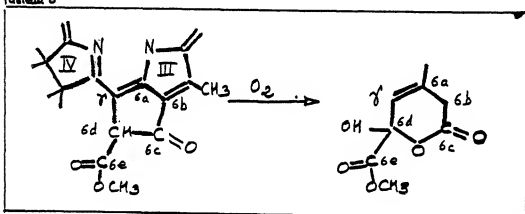


Figure 6 'Hétérogénéité' moléculaire des chlorophylles A et B des échantillons de la 2^e série :

- étude spectrophotométrique préliminaire sur le chromatogramme (81-27) - Echantillons : 3-5 et B1e'
 Les anomalies présentées par l'échantillon 5 proviennent du vieillissement (conservation sur plaques à -24°C) pendant 6 mois

Il semble que cela puisse correspondre à une allomérisation (réversible car instable) telle qu'elle a été décrite dans le cas du méthyl-phéophorbide b par CONANT et al., 1930, J. Am. Chem. Soc., 52, 3013.

Tableau 6



Deux formes de phéophytines sont également observées : il ne semble pas s'agir ici des phéophytines A et B, comme il est possible de les caractériser par l'action de HCl (BOUNIAS, 1969, Thèse n° d'ordre 308 et : ouvrage sous presse) : toutes deux présentent, en effet, le même spectre caractéristique de la phéophytine A (fig. 7) : il s'agit donc vraisemblablement des formes A et A', la seconde étant la plus polaire, donc dérivée de la chlorophylle A'.

La phéophytine B ne semble pas se former aussi aisément que la ph. A : la meilleure stabilité de la chlorophylle b ne peut guère provenir que de l'effet de polarisation du radical $\left[-\overset{+}{C} \equiv \overset{-}{O} \right]$.

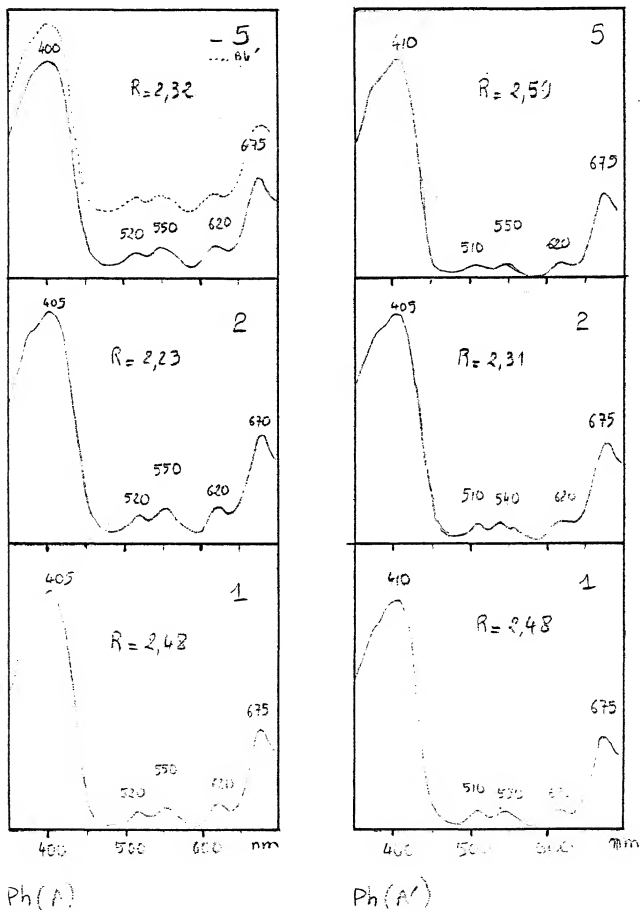


Fig. 7 - Spectre des 2 formes de phéophytines apparues dans les échantillons de la 2^{ème} série (Réf. 81-27)

Les caroténoïdes ne présentent pas de telles anomalies. Les extraits contiennent les principaux composants habituels de la feuille, avec quelques réserves par rapport aux cas les plus simples : la néoxanthine se sépare difficilement, ici, de certains dérivés chlorophylliens polaires (chlorophyllides, phéophorbides), de même qu'un pigment légèrement plus polaire que la lutéine, présent en petites quantités, et qui peut être identifiable soit à la Zéaxanthine, soit à un époxyde (5-6 ?) de la Lutéine.

À titre de comparaison, voici les teneurs pigmentaires de feuilles d'autres végétaux : (nmoles /mg)

Tableau 7

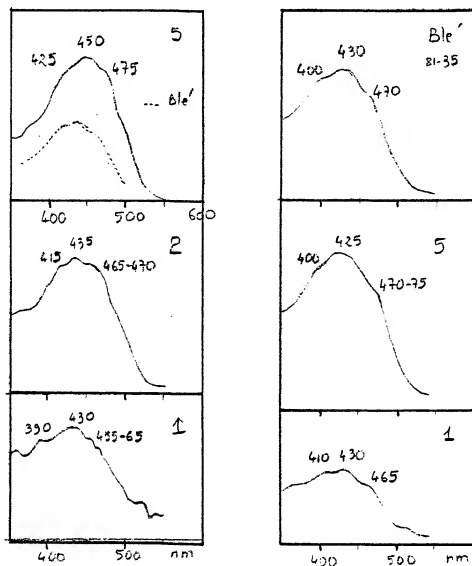
| Pigments | <i>Arabidopsis thaliana</i> | <i>Capsicum annum</i> | <i>Hordeum vulgare</i> |
|------------------|-----------------------------|-----------------------|------------------------|
| chlorophylle A | $1,02 \pm 0,11$ | — | $0,91 \pm 0,060$ |
| chlorophylle B | $0,51 \pm 0,09$ | — | $0,55 \pm 0,035$ |
| β Carotène | $0,124 \pm 0,02$ | 0,147 | $0,22 \pm 0,015$ |
| Lutéine | $0,234 \pm 0,026$ | 0,246 | $0,32 \pm 0,020$ |
| Violaxanthine | $0,100 \pm 0,01$ | 0,138 | $0,26 \pm 0,017$ |
| Néoxanthine | $0,052 \pm 0,005$ | 0,094 | $0,10 \pm 0,007$ |
| Références bibl. | (1) | (2) | (3) |

(1) BOUNIAS, Thèse Dr Ing. 1969 (N°308), Dr. Etat ès sc. 1972 (N°98)

(2) CHOLNOKY, GYÖRGYFY, NAGY & PANCZEL, 1956, Nature, 178, 410

(3) BOUNIAS, 1975, Can. J. Bot., 53, 708-718.

La fig. 8 montre toutefois une tendance au décalage vers les courtes longueurs d'ondes du spectre du β carotène dans les échantillons les plus rapprochés du "phénomène". Cela peut correspondre soit à une époxydation (en 5-6 ou 5-8), soit à une isomérisation d'une forme trans vers une forme cis (MASS & WEEDON, 1976, in: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments - GOODWIN Ed. - 2nd Ed. p 149-224. London: Acad. Press -)



β Carotène

pic 450 \rightarrow 430 : époxide

pic 475 \rightarrow 460 : torsion moléc
Trans \rightarrow cis

Lutéine

400 \rightarrow 410 : C=O ou d. l.

470 \rightarrow 465 : trans \rightarrow cis

81-27 : caroténoïdes

Fig. 8. Spectre des caroténoïdes dans les échantillons de la 2^{ème} série
(chromatogramme Réf. 81-27)

Le premier chromatogramme (fig 5) correspondant aux échantillons de la 2^{ème} série a donné les résultats suivants (nmole/mg)

Tableau 8

| Pigments | E-1 | E-2 | E-3 | E-4 | E-5 | E-6 |
|---|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| chloroph. A | 0,005 | 0,010 | 0,016 | 0,017 | 0,021 | 0,0082 |
| chloroph. A' | 0,353 | 1,08 | 1,14 | 1,17 | 1,25 | 1,28 |
| chloroph. A'' | Trace | 0,008 | 0,0088 | 0,0116 | 0,0281 | 0,0398 |
| chloroph. B | 0,030 | 0,031 | 0,030 | 0,037 | 0,049 | 0,031 |
| chloroph. B' | 0,13 | 0,23 | 0,22 | 0,15 | 0,18 | 0,14 |
| Phéophyt. A' | 0,174 | 0,21 | 0,16 | 0,12 | 0,098 | 0,026 |
| Phéophyt. A | 0,27 | 0,50 | 0,61 | 0,58 | 0,53 | 0,50 |
| β Carotène | 0,090 | 0,106 | 0,12 | 0,158 | 0,195 | 0,251 |
| Lutéine | 0,089 | 0,087 | 0,123 | 0,140 | 0,175 | 0,287 |
| Violaxanthine + Neoxanthine + chlorophyllides | 0,327 | 0,538 | 0,468 | 0,746 | 0,592 | 0,655 |
| Protochloroph.(4) | 0,061 | 0,13 | 0,12 | 0,18 | 0,13 | 0,13 |
| Protochloroph.(3) | 0,071 | 0,23 | 0,21 | 0,20 | 0,16 | 0,16 |

Ces données numériques font apparaître différentes relations quantitatives entre les teneurs pigmentaires et la distance qui sépare les échantillons du point central du "premier".

Abréviations utilisées :

$$\begin{aligned}
 \Sigma \text{Chl A} &= \text{Chl. A} + \text{Chl A}' + \text{Chl A}'' \\
 \Sigma \text{Chl B} &= \text{Chl B} + \text{Chl B}' \\
 \Sigma \text{Ph A} &= \text{Ph A} + \text{Ph A}'
 \end{aligned}
 \left. \vphantom{\begin{aligned} \Sigma \text{Chl A} \\ \Sigma \text{Chl B} \\ \Sigma \text{Ph A} \end{aligned}} \right\} \Sigma \text{Chl A} + \Sigma \text{Chl B} = \Sigma \text{Chl (A+B)}$$

a) chlorophylles $f(d)$

Les teneurs en chlorophylles (A) croissent en fonction de la distance (d) du centre du "phénomène" : $N=6$; $\rho = +0,6868$ ($P = 0,546$)^{*} (fig 9A)

La corrélation devient beaucoup plus stricte si l'on exprime les teneurs en fonction de l'inverse des distances, après changement de coordonnées tel que : $D = d+1$ (pour éviter 0-1) :

$$N=6 ; \rho = -0,990 \quad (P = 4,1 \cdot 10^{-6})$$

(pente $-1,054$ - intersections : $1,448$ et $1,37$) (fig 9B)

Les chlorophylles B ne montrent pas de corrélation significative, mais la somme (A+B) conserve les mêmes propriétés (fig 9C)

Le rapport $\frac{\sum \text{Chl. A}}{\sum \text{Chl. B}}$ augmente également avec d ($\rho = +0,7509$)

($P = 0,031$) et la relation, comme précédemment, se rapproche de la linéarité en fonction inverse des distances : $(d+1)^{-1}$ (fig. 10A)

$$N=6 \quad \rho = -0,891 \quad (P = 0,0039)$$

(pente $b = -5,02$; intersections : $6,925$ et $1,37$) (fig 10B)

Chez diverses plantes, le rapport Chl A/Chl B. diminue avec l'âge, tandis que les phéophytines tendent à s'accumuler (BOUNIAS, Thèse 1972, n°98). Ainsi, chez l'Orge le rapport A/B passe de 4,13 (au stade 4 jours) à 1,52 (au stade 24 jours) et chez l'Arabidopsis : de 2,16 (au stade 13 jours) à 1,70 (au stade 25 jours). Dans le même temps, la teneur en phéophytines passe de 0 (à 13 jours) à 0,15 (à 24 jours) puis décroît en raison de la baisse de teneur en chlorophylles.

C'est ce que nous allons examiner également ici.

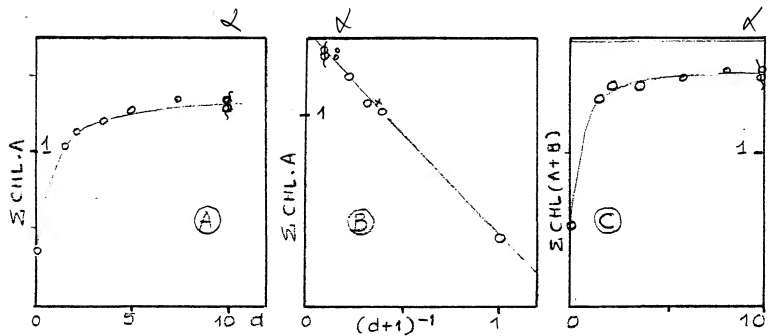


Fig. 9. Modifications des teneurs en chlorophylles en fonction de la distance d au centre du "phénomène"

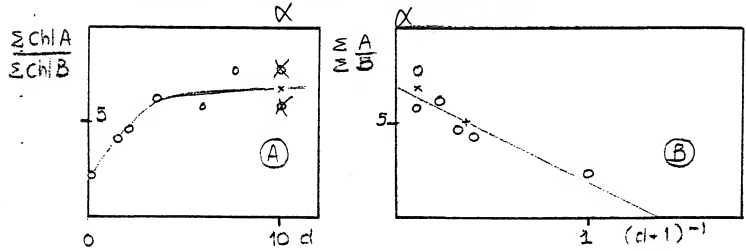


Fig. 10. Evolution du Rapport chl A/chl B en fonction de la distance d

b) Phéophytines

Le tableau précédent montre que la teneur en phéophytine A' va en décroissant du point $d=1,5$ (E-2) au point $d=10m$ (E-5 et E-6). Cette relation prend toute sa signification lorsque les phéophytines sont exprimées relativement aux concentrations en chlorophylles (A) dont elles sont issues : il apparaît ainsi (fig. 11 A) que dans l'extrait E-1 (au centre du "phénomène") la proportion relative de phéophytines est de très loin au point maximum. Les variations sont plus prononcées dans le cas du rapport $Ph.A' / \Sigma Chl A$ que dans le cas de $\Sigma Ph(A+A') / \Sigma Chl A$ (fig 11 B et 11 A resp.)

Lorsque ces rapports sont exprimés en fonction de $(d+1)^{-1}$, celui qui englobe $Ph(A+A')$ donne lieu à une relation linéaire :

$$N=6 \quad \rho = +0,990 \quad (P = 4 \cdot 10^{-6})$$

$$\text{Intersections : } [0,359 ; -0,41] \quad (\text{fig 11 C})$$

Pan contre, dans le cas du rapport $Ph A' / \Sigma Chl(A) = f(d+1)^{-1}$, la courbe n'est pas complètement redressée (fig 11 D) quoique la corrélation reste très forte : $\rho = 0,993$ ($P = 1,4 \cdot 10^{-6}$).

La courbe peut être redressée de manière plus satisfaisante par l'emploi des coordonnées bi logarithmiques naturelles : la régression de $\ln \frac{Ph A'}{\Sigma Chl A}$ sur $\ln(d+1)$ donne pour $N=5$: $\rho = -0,916$ ($P = 0,28 \cdot 10^{-3}$)

$$\text{Intersections : } -0,72 ; +0,68$$

$$\text{pente : } b = -1,06$$

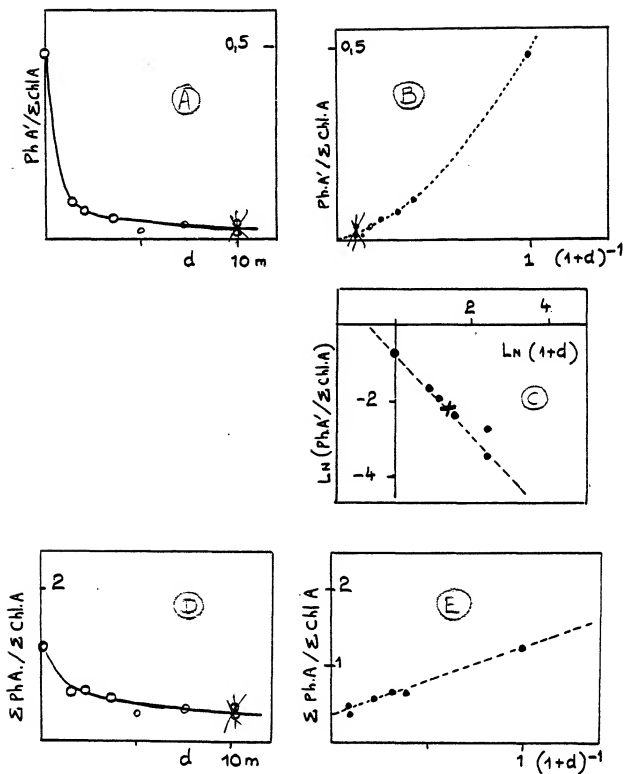


Fig 11. Modifications en fonction de la distance "d" de la proportion de phéophytines A et A' relativement à la chlorophylle A totale : coordonnées naturelles (A-D) inverses (B-E) et bilogarithmiques (C).

c) Caroténoïdes

Les figures 12 A et B montrent respectivement les variations des concentrations en β carotène et en Lutéine en fonction de d. Les paramètres résultant du calcul de corrélation-régression linéaire sont rassemblés dans le tableau ci dessous.

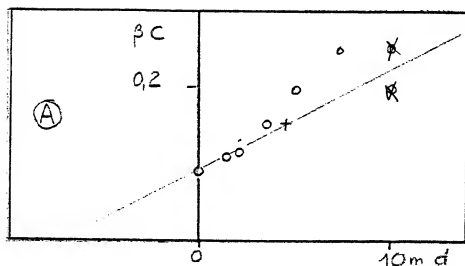
Tableau 9

| paramètres statistiques | β Carotène | Lutéine |
|-------------------------------------|------------------|-----------|
| N = nombre de couples | 6 | 6 |
| Coeff. de Corrél. ρ | 0,945 | 0,871 |
| Probab. Signif. P | 0,0022 | 0,012 |
| Pente b | 0,0130 | 0,0148 |
| Intersections $/x$ | 0,094 | 0,083 |
| $/y$ | -7,22 | -5,62 |
| Point médian ($\bar{x}; \bar{y}$) | 0,15/4,51 | 0,15/4,51 |

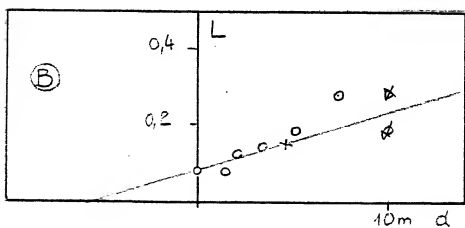
d) Discussion -

Un premier examen montre que les pigments "fonctionnels" sont d'autant plus concentrés que les échantillons sont éloignés du centre du "phénomène". La relation paraît linéaire dans le cas des caroténoïdes et asymptotique dans le cas des chlorophylles : dans ce dernier cas, les valeurs atteignent très rapidement un seuil élevé.

En revanche, les chlorophylles perdent d'autant plus leur noyau de magnésium que les échantillons s'approchent du "phénomène". Dans ce cas, la variation est très brutale et obéit plutôt à une loi de type exponentiel.



K



X

Fig. 12. Variations de concentrations en caroténoïdes en fonction de la distance d. $\beta C = \beta$ carotène : (A)
L = Lutéine : (B)

NOUVELLES SÉRIES D'ANALYSES

D'autres analyses chromatographiques effectuées ultérieurement ont montré des résultats concordants.

La figure 13 montre les chromatogrammes comparés des échantillons 1 et 5 (réf. 81-29 bis) dans lesquels les composants hydroxy-caroténoïdiques ont été séparés plus complètement, au dépens des phéophytines A et A'.

L'excès de phéophytines et le défaut de tous les autres pigments y est particulièrement évident, dans l'échantillon 1 ($d=0$) relativement à l'échantillon 5 ($d=10m$).

Une comparaison des spectres d'absorption des chlorophylles A, A' et B a été réalisée dans une autre série d'extraits, caractérisés par un retour de la forme B' vers la forme B pour l'ensemble des échantillons. La fig 14 illustre les résultats.

Les formes A et B présentent une mobilité chromatographique normale et la position des maxima de leur spectre est également conforme à celle des étalons. Les formes A' montrent un léger décalage du pic "rouge" de 677 vers 675 nm. Le rapport $\lambda_{410nm}/\lambda_{677nm}$ y est élevé (supérieur à 2) et sa valeur est constamment plus forte dans l'échantillon 1 ($d=0$) que - par exemple - dans l'échantillon 4 ($d=3,5m$). Compte tenu des relations entre la structure moléculaire et les propriétés physiques des chlorophylles (STRAIN, THOMAS & KATZ, 1963, B.B.A., 35, 306) cela semble trahir une tendance à l'oxydation :

- d'un radical $-\overset{3}{C}H_3$ en $-\overset{3}{C}H=O$ par exemple, de chl. A à chl. B
- Peut-être d'un radical éthyle $-\overset{2}{C}H=\overset{2a}{C}H_2$ en époxyde : $-\underset{\underset{O}{|}}{CH}-CH_2$ (instable) qui influencerait alors peu la mobilité, masqué par les carbones $\alpha-2a-2b$ de la molécule.

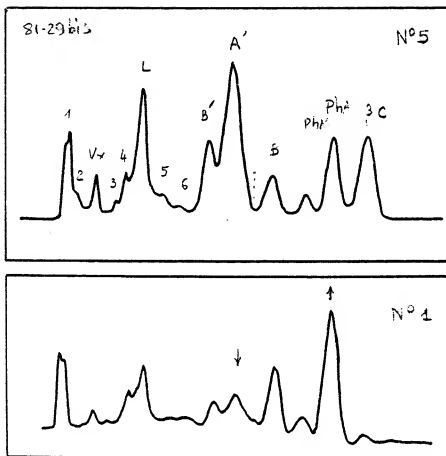


Figure 13. Chromatogrammes comparés des pigments photosynthétiques des Échantillons 1 et 5.

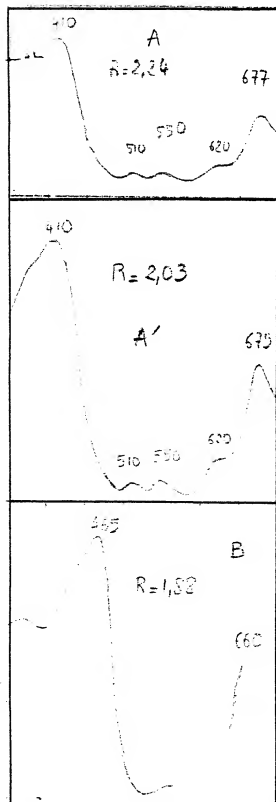
1 et 2 : Chlorophyllides + Phéophorbides + Néoxanthine

3 : protochlorophyllides

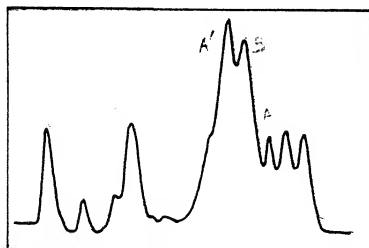
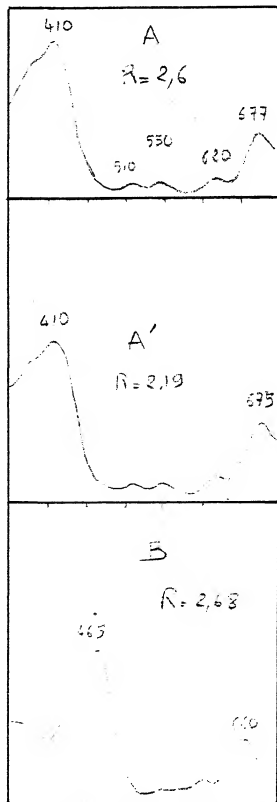
4 : Zéaxanthine ou Lutéine-époxyde

5-6. Cryptoxanthine et oxy-chlorophylles

Echantillon 4



Echantillon 1



400 500 600 nm

Fig. 14. Comparaison des spectres des chlorophylles A, A'-B dans les Echantillons 1 et 4 (Chromatogrammes réf. 81-28)

Comparaison avec les pigments du Ble'.

Les chromatogrammes des échantillons 1 à 5 (résultant d'une nouvelle série d'extractions) ont été comparés à ceux du Ble' (Réf. 81-85)

La conservation des prélèvements et leurs manipulations successives (réchauffements partiels et re-congélation) se traduit assez curieusement par un retour de la chl. B' vers la forme B, tandis que la chl. A. s'est largement transformée en phéophytine dans l'échantillon 1. Les formes A' et B' subsistent dans les autres cas.

NB. Les deux formes dominantes (à l'exception de l'échantillon 1) sont la chl. B et la chl. A', ce qui nous a donné pendant un certain temps l'impression d'une inversion de polarité des chl. A et B !

Le fig 15 montre les chromatogrammes comparés d'extraits de Ble', relativement aux échantillons 1 ($d=0$) et 6 ($d=7.5$ m).

Les spectres d'absorption des chlorophylles A, A', B, B' et de la phéophytine A sont présentés sur la fig. 16 et la fig 17

Le rapport $\lambda 470/\lambda 655$ est similaire dans E-5 et dans le Ble' - tandis qu'il augmente dans E-1 comme nous l'avons déjà observé.

Ce même rapport ($\lambda 415/\lambda 670$) n'est pas augmenté chez A' relativement à la forme A, ce qui confirme bien que - s'il s'agit d'une oxydation - celle-ci ne porte pas sur le carbone 3c qui distingue la chl. A de la chl. B mais sur un autre (cf. p 29).

NB. La Spectrophotométrie directe sur plaques caractérise parfaitement l'importance relative prise par les pics $\lambda 515-550-620$ nm chez la phéophytine A par rapport à la chlorophylle dont elle dérive. En revanche, l'écartement des pics 415 et 670 de la chl. A est moins grand ($\rightarrow 410$ et 675 nm pour la ph. A).

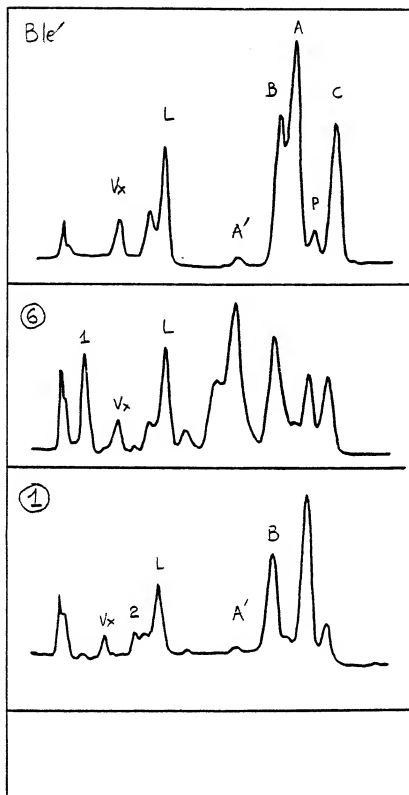


Fig. 15. Chromatogrammes des extraits pigmentaires des échantillons 1 et 6 comparés à ceux du Ble' (Réf. 81-35)
1 et 2 dérivés des chlorophyllides.

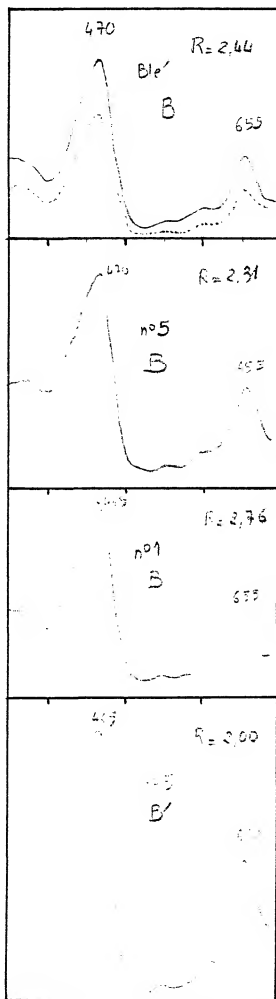
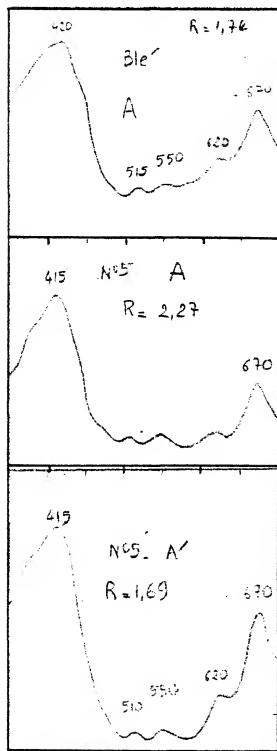


Fig. 16 - Spectres des chl. A.
 A'-B-B' dans les extraits
 E-1., E-5 et Ble'.

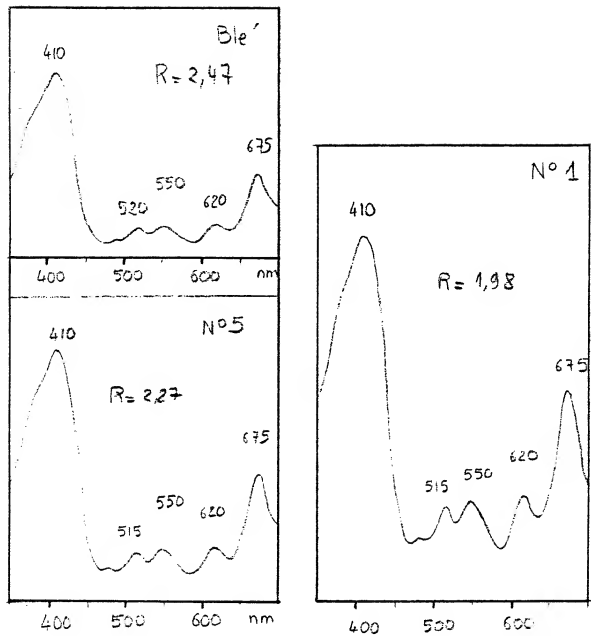


Fig. 17. Comparaison du Spectre des Phéophytines A dans les extraits E-1, E-2 et de Ble'.

Dérivés chlorophylliens -

Cette série d'analyses (21-35) a permis, par ailleurs, de mieux caractériser deux dérivés chlorophylliens notés (1) et (2) sur la fig. 15.

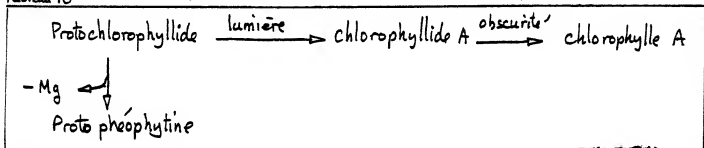
Les spectres respectifs de ces deux composés sont présentés sur la fig. 18. Le premier, de faible mobilité, devrait correspondre à un Méthyl Chlorophyllide (moins polaire que le chlorophyllide, en raison du radical méthyle) et le second à un proto-chlorophyllide, (forme réduite) selon l'échelle des mobilités relatives de SCHNEIDER (op.cit. 1969).

Le Méthyl-chlorophyllide A présente au moins deux pics principaux à 427,5 et 660,5 nm (PENNINGTON et al., 1964, J. Am. Chem. Soc. 86, 1418).

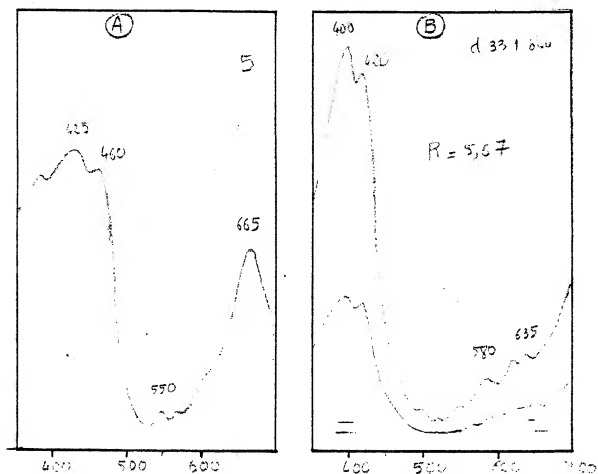
Le second composé présente une couleur bleue : son spectre se caractérise par l'absence (ou le déplacement) de la bande d'absorption dans le rouge. Par comparaison avec un spectre de protochlorophylle dans le Méthanol, (KOSKI, FRENCH & SMITH, 1951, Arch. Biochem. Biophys., 31, 1) (fig 18 c) il est possible de relever l'analogie des rapports d'absorption bleu/rouge : 6,6 pour la protochlorophylle contre 5,7 pour le dérivé étudié^(*). Toutefois, d'autres travaux montrent une disparition du pic 630 nm chez les proto phéophytines, dans l'éther (KOSKI & SMITH, 1948. J. Am. Chem. Soc., 70, 3558) (fig 18-D).

Ce point est important en égard aux voies de biosynthèse de la chlorophylle A dont WOLFF & PRICE, 1957, Arch. Biochem. Biophys., 72, 293, ont montré deux étapes photo-contrôlées de manières opposées :

Tableau 10



(*) Ces analogies s'étendent à la chlorophylle C de structure mal connue !... Elles suggèrent également une structure de porphine plutôt que de "chlorine" (JEFFREY, 1963. Biochem. J., 96, 213).



41-55 dérivé faible Mea
(2 mm)

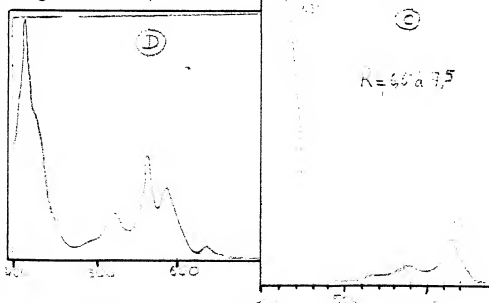
Methyl chloride

Protochloride

Fig. 18 Spectres de 2 dérivés chlorophylliens de forte (A) et moyenne (B) polarités.

C = Protochlorophylle

D = Protochéophytine



L'importance que nous pouvons attribuer à ces deux composés, que nous désignons par MeChld et PrChld, tient à leurs variations en fonction de la distance des échantillons par rapport au centre du "phénomène".

La fig. 19(A-B) montre les courbes déterminées à partir des chromatogrammes du groupe Réf. 81-35.

L'allure sigmoïde des graphes suggère une équation générale du type :

$$C = \frac{C_m \cdot D^n}{k + D^n}$$

dans laquelle : C = concentrations

D = (d+1) avec d = distance du centre du "phénomène"

k = constante dépendant de l'"affinité" entre le mécanisme et D

n = paramètre exponentiel.

La transformation en : $\ln\left(\frac{C}{C_m - C}\right) = n \ln D - \ln k$

permet d'obtenir les courbes correspondantes : fig 19 (C-D),

les valeurs respectives de C_m ayant été estimées à 2200 et 2600 après transformation en coordonnées inverses et extrapolation sur l'axe des ordonnées à partir des deux points les plus éloignés du centre (cf.

BOUNIAS, 1979. Comp. Biochem., 63B, 407-417)

Le calcul de régression donne alors les résultats suivants :

Tableau 11

| | Me.Chld. | Pr.Chld. |
|-------------|--|----------------------------------|
| Corrélation | $\rho = +0,970$ ($P = 0,67 \cdot 10^{-3}$) | $\rho = +0,955$ ($P = 0,0015$) |
| Pente n | $n = 1,78$ | $n = 1,61$ |
| Constante k | $k = 4,41$ | $k = 2,61$ |

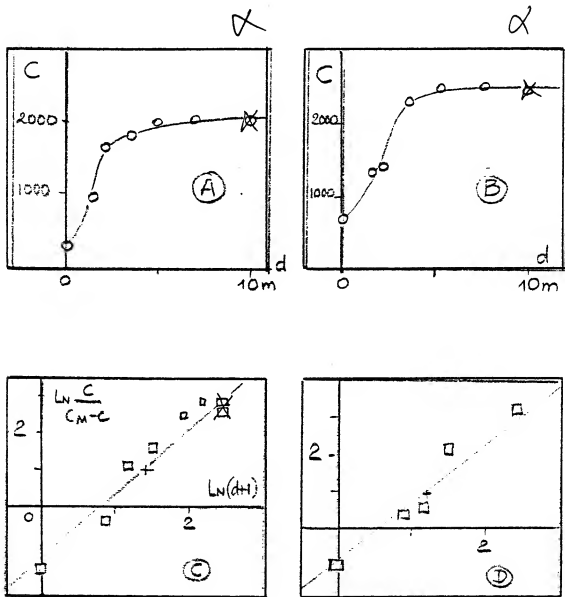


Fig 19 - Variations des concentrations en MeChld. et PrChld. en fonction de d :

A et B : coordonnées naturelles

C et D : coordonnées de HILL

Nouvelles extractions par l'acétone à 80%

• L'acétone à 80% extrait d'autant mieux les pigments que leur structure est plus polaire: ce sont donc les carotènes neutres (apolaires) qui sont extraits avec le moins bon rendement.

Cette technique a permis de procéder à une évaluation comparée des pigments chlorophylliens au moyen des formules citées page 9.

Les résultats montrent que la phéophytine et les chlorophyllides sont pris en compte comme des chlorophylles par l'évaluation spectrophotométrique (Tableau ci-dessous) (cf. ANDERSON & CALVIN, 1962, Nature, 194, 225)

Tableau 12

| Echantillons : | E-1 | E-2 | E-6 |
|----------------------------|------|------|------|
| Σ chl. A nmole/mg : | 0,77 | 1,00 | 1,07 |
| Σ chl. B nmole/mg : | 0,47 | 0,97 | 1,03 |

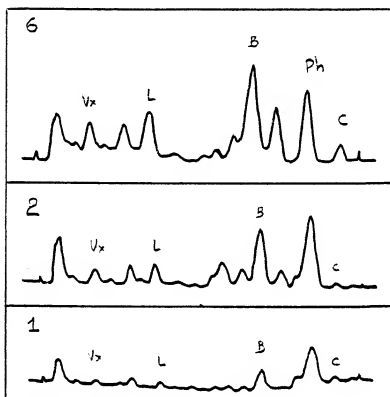
[Par chromatographie, à titre d'exemple pour l'échantillon E-1, le rapport Ph.A/Chl B $\approx 1,75^{(*)}$, tandis que par spectrophotométrie: ChlA/ChlB = 1,64]

Il est donc strictement-indispensable de procéder à une séparation des divers pigments pour que les résultats des dosages soient interprétables, dès lors que les chlorophylles A et B ne sont pas les seuls composants

Le dépouillement des chromatogrammes est en cours. La fig 20 en illustre quelques exemples.

(*) Rapport des surfaces de pics

81-40 Acétone 80%



81-39 Acétone 80%

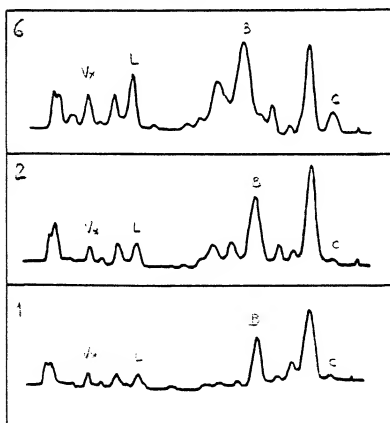


Fig. 20. Chromatogrammes de pigments photosynthétiques extraits par l'acétone à 80% (Réf. 81-39 et 81-40)

Les échantillons de la 1^{re} série présentent une composition pigmentaire qualitativement conforme à la normale, si l'on excepte une teneur élevée en phéophytine, vraisemblablement due aux conditions d'acheminement (dérachement à température ambiante).

Les feuilles récoltées sur la trace présentent un affaiblissement pigmentaire quantitatif de l'ordre de 30 à 50 % : cet effet est maximal chez les jeunes feuilles au niveau du β carotène (-57%) et de la violaxanthine (-80%).

Les échantillons de la 2^e série présentent une double particularité :
a) les chlorophylles sont décomposées en plusieurs formes isomériques ou allomériques, quelle que soit la proximité du "phénomène", entre 0 et 10 m.

Une hypothèse pourrait être émise, faisant appel aux effets "retardés" d'un champ énergétique dont l'action, à ce niveau, se serait donc transmise jusqu'à ^{7.6} 10 m au moins : il conviendrait toutefois de renouveler les analyses sur le même site (donc même biotope) au début de 1982, c'est à dire sur des plants de même stade physiologique mais n'ayant pas été "exposés" au "phénomène".

L'analyse quantitative montre par ailleurs diverses corrélations entre les teneurs pigmentaires et la distance des échantillons depuis le centre du "phénomène" : les chlorophylles et dérivés varient très rapidement à proximité immédiate de la trace, tandis que les caroténoïdes varient en fonction linéaire de la distance ; la pente qui traduit la dynamique de ces variations tend à augmenter avec la complexité des molécules, donc avec leur "fragilité" chimique.

Cette fragilité peut être caractérisée dans certains cas par de très discrètes altérations du spectre d'absorption des pigments (décalages de certains maxima vers les courtes longueurs d'ondes). De telles altérations sont perceptibles sur tous les échantillons (de 0 à 10 m), mais certaines sont plus prononcées dans les plus rapprochées du "phénomène": c'est le cas du rapport des absorbances relatives maximales "bleu/rouge", qu'il est possible de mettre en relation avec certaines formes d'oxydations.

COMPARAISON AVEC LES EFFETS DES RAYONNEMENTS "Gamma"

A titre indicatif, nous pouvons comparer les effets observés ici à ceux que produisent, au niveau des feuilles cotylédonnaires d'une microcruce (Arabidopsis thaliana), les rayons γ du Cobalt-60 appliqués aux graines sèches, une semaine avant la germination (il s'agit donc, dans les deux cas, d'effets primaires retardés). (résultats en nmol/mg) *

Tableau 13

| Doses (K.rad) | 0 | 35 | 250 | 500 | 750 | 1000 |
|------------------|------|------|------|------|------|------|
| chlorophylle A | 0,26 | 0,25 | 0,23 | 0,22 | 0,18 | 0,20 |
| chlorophylle B | 0,19 | 0,21 | 0,23 | 0,17 | 0,13 | 0,13 |
| β Carotène | 0,06 | 0,09 | 0,18 | 0,06 | 0,05 | 0,05 |
| Lutéine | 0,13 | 0,11 | 0,17 | 0,09 | 0,08 | 0,10 |
| Violaxanthine | 0,07 | 0,07 | 0,13 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Néoxanthine | 0,08 | 0,05 | 0,14 | 0,03 | 0,03 | 0,08 |

Une dose de 10^6 rads n'affecte que de 30% la chl. A, de 46% la chl. B, de 40% la violaxanthine, de 20% le β carotène et de 30% la lutéine. En outre, une augmentation de teneurs en caroténoïdes est

...

* TSUP: réf bibl.

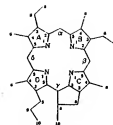
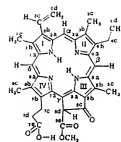
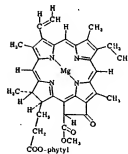
observée à 250 k.rads : il lui correspond alors l'apparition d'un pigment rouge de mobilité $MR \approx 0,94$ relativement au β carotène. Le spectre d'absorption de ce composé est décalé de 50 à 55 nm vers le rouge, par comparaison avec celui du carotène.
 * (BOUNIAS, 1973. Arabidopsis Inf. Serv. (Göttingen), 10, 26-27).

Il apparaît donc qu'une dose de 1 million de rads suffit à peine à altérer les chlorophylles dans des proportions comparables à celles observées à la suite du "phénomène", et ne parvient nullement à entraîner d'aussi importantes diminutions au niveau des caroténoïdes.

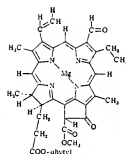
Deux analogies, toutefois, sont à remarquer : d'une part, les chlorophylles du groupe B sont les plus stables dans les deux cas ; d'autre part, le pigment supplémentaire apparu sous l'action des rayons γ se caractérise par une mobilité comparable à celle de la phéophytine A, dans les mêmes conditions analytiques ($MR \approx 0,890$ à $0,915$) : or la phéophytine s'accumule d'autant plus que les échantillons sont plus rapprochés du "phénomène". Observons à ce propos que l'oxydation de la chlorophylle C conduit à un dérivé instable de couleur rose-pourpre (VERNON & SEELY, 1966. The Chlorophylls, Acad. Press, p. 36) et que les porphyrines hématiniques à noyau ferrique sont rouges (sang des vertébrés) !

Notons, enfin, que les relations "structures/spectres" sont extrêmement délicates à manipuler : ainsi, les radicaux électrophiles de substitution exercent un effet bathochrome lorsqu'ils s'appliquent aux carbones 2-6-et γ et un effet hypsochrome (décalage vers les courtes longueurs d'onde) lorsqu'ils s'appliquent en position 3... (VERNON & SEELY, op. cit. p. 75 ; SEELY & JENSEN, 1965. Spectrochim. Acta, 21, 1835).

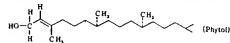
RAPPELS de STRUCTURES

Wittenberg and Shemin's
numbering systemNumbering system for
naturally occurring porphyrins

Chlorophyll a



Chlorophyll b



Chapitre II

CO-FACTEURS PHOTOSYNTHÉTIQUES

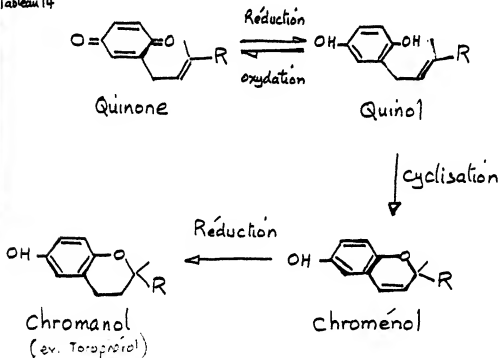
INTRODUCTION

Nous désignons sous ces termes un ensemble de composés intervenant plus ou moins directement dans la photo-phosphorylation, où ils agissent comme transporteurs d'électrons.

La plupart ont une structure de type quinonique reliée à un radical isoprénocide R souvent identique au radical phytyle des chlorophylles.

Les différentes formes naturelles peuvent se représenter schématiquement comme suit :

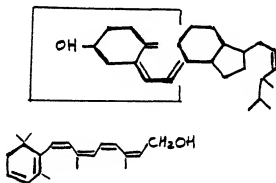
Tableau 14



Notons l'analogie avec la structure de la vitamine D₂ :

et les différences

avec la vitamine A₂ :



BASES ANALYTIQUES

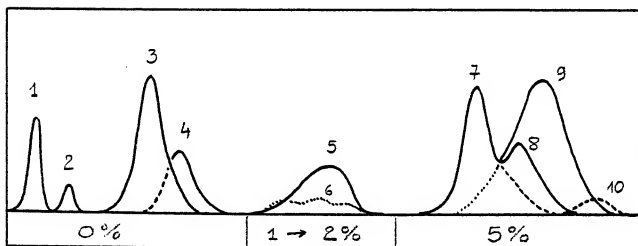
Les divers composants sont extractibles par les mêmes solvants que les pigments chlorophylliens et caroténoïdes. Leur polarité est comprise entre celle des chlorophylles et celle du β carotène.

La fig. 21 montre un profil d'élué par chromatographie sur colonne d'alumine ($0,5 \times 10 \text{ cm}$) réalisée à partir d'un extrait de feuilles de Chêne vert. Les différents composants sont assez aisément caractérisés par leurs spectres d'absorption, principalement dans l'ultraviolet (plastoquinone A: double pic λ 254-263 nm, par exemple).

La chromatographie en couches mince sur plaques de silice constitue une micro-méthode de choix (BOUNIAS, 1969. Chimie Analytique / 1969. Thèse / 1972. Thèse / op. cit.) et la fig. 22 illustre les résultats pouvant être obtenus à partir d'extraits d'Arabidopsis thaliana sur plaques Eastman Kodak, avec révélation au pentachlorure d'antimoine.

D'autres possibilités, sur couches Merck, sont présentées sur la fig. 25 B avec révélation à l'acide perchlorique, moins polychromique, mais d'un emploi plus commode et moins dangereux que le précédent. Dans ce dernier cas, les autres classes de lipides interfèrent, toutefois, davantage avec les co-facteurs (fig. 25 A et B)

Les résultats numériques sont présentés en unités d'intégration (mm en 20 éch. 0 à 0,5) par mg de poids frais.

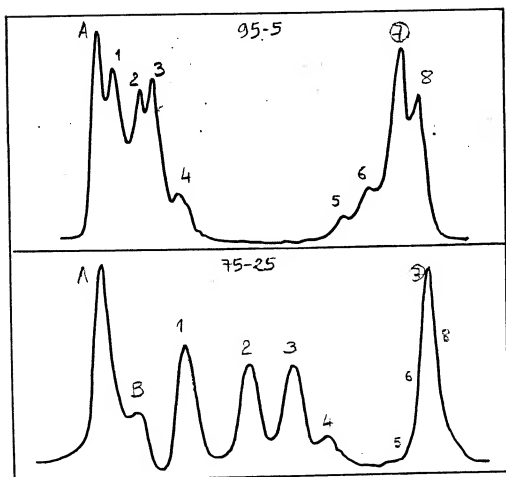


- | | |
|-----------------------|------------------------|
| 1 Caroténoïdes | 6 - non identifié |
| 2 Vitamine K | 7 - Plastoquinone C |
| 3 Plastoquinone A | 8 - Plastoquinone D |
| 4 α Tocophérol | 9 - Tocophéry] quinone |
| 5 Plastoquinone B | 10 - non identifié |

Colonne d'Alumine (10cm x ϕ 0,4cm)

Eluant: Ether de Pétrôle \pm éther diéthylique (%)

Fig. 21. Séparation des co-facteurs photo-synthétiques par chromatographie en phase liquide.



A, B = Chlorophylles et dérivés

1-2-3- Chroménols libres et phosphorylés

4 - Pq.C (cyclisé)

5 - Pq A

6 - chroménol

7 - Carotènes

8 - chroménol "haut" (apolaire)

Plaque K301 V (gel de silice)

Eluant : Cyclohexane - éther diéthylique.

Fig. 22 - Chromatogramme des co-facteurs extraits de
feuilles d'Arabidopsis, sur couches minces de gel de silice.
Eluant : Cyclohexane - éther diéthylique 95-5 (v/v) (en haut)
75-25 (v/v) (en bas)

A. Résultats portant sur la 1^{ère} série

La fig. 23 montre deux chromatogrammes obtenus sur plaques Kodak révélées avec $SbCl_5$ en solution à 20% dans CCl_4 (ou $CHCl_3$).

Les composants ne peuvent être identifiés directement à partir du chromatogramme-étalon (fig. 23 B) car nous ne disposons pas des produits purifiés nécessaires. L'étude qui suit a donc été conduite par comparaison avec des travaux expérimentaux réalisés de 1965 à 1967 : depuis lors, bien des détails pratiques ont changé, et les expérimentations de 1981 n'ont pu être reproduites exactement dans les mêmes conditions.

Certaines indications significatives peuvent, toutefois, être déduites de l'étude de la mobilité relative des composants (par rapport au β carotène) et des relations entre la structure et la forme des spectres d'absorption après révélation. (BOUNIAS, 1969, Chimie Analytique, 51, 76-82)

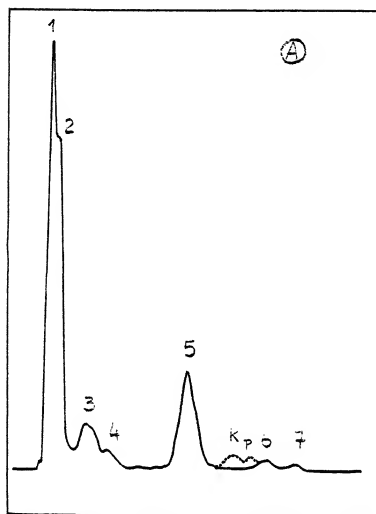
Les fig. 24 et 25 présentent quelques données de référence et la fig. 26 les spectres de quelques composants à identifier.

Relativement à la numérotation des composés à déterminer, selon la fig. 23, quelques observations doivent être mentionnées :

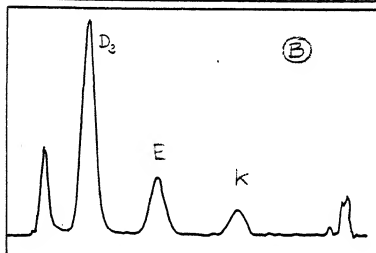
Composé (2) : mobilité et coloration identiques à celles de la vitamine A. Spectre plus proche de celui de Chroménols apolaire (haute MR) ou de chroménols-phosphorylés. Hypothèse : dérivé oxydé de la vit. A.

Composé (3) : Dans l'échantillon E 11 : mobilité, couleur et spectre compatibles avec ceux de la tocophéryl-quinone (les dentelures sont des artefacts dus à la conservation - le double pic λ 430-460 nm rappelle la vit. K).

Dans E-4 apparaît un pic à 530 nm qui indique une cyclisation en Chroménol. Hypothèse : tocophéryl chroménol formé sur place à partir d'une tocophéryl quinone plus "fragile".



- 1 = Riboflavin (Chloroph)
 2 = Vit. A (-caroténoïde)
 3 = Tocophérol (vitamine)
 4 = Tocophérol (vitamine)
 5 = Cholérol-P
 6 = β Carotène
 7 = Plastocholérol A
 Kp = Plastocholérol A



- Vitamines : D₂
 E
 K
 (étalons 10 nmol)

Fig. 23. Chromatographie des Cofacteurs sur
 plaques de Silice Kodak "K 301 V" : A = extrait
 B = étalons ("vitamines" D₂, E et K) - (Réf. 81-08)

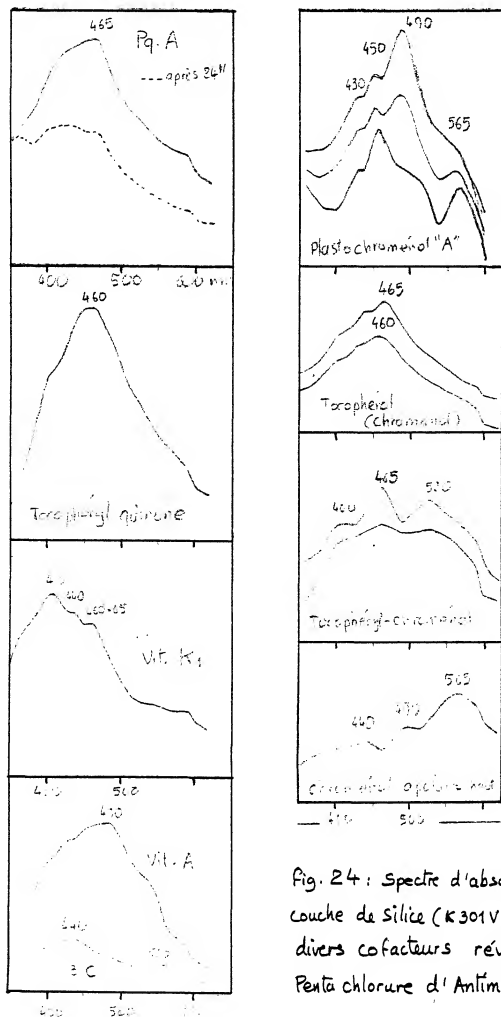


Fig. 24: Spectre d'absorption sur couche de silice (K301V) de divers cofacteurs révélés au Penta chlorure d'Antimoine

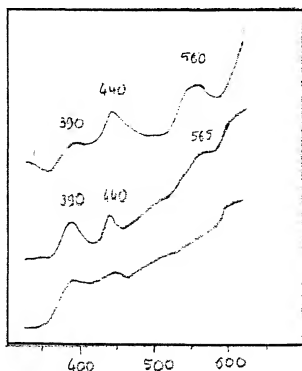


Fig 24 bis . Spectres
d'absorption des quinols-
phosphorylés naturels extraits
d'*Arabidopsis* (couches de
Silice K301 V)

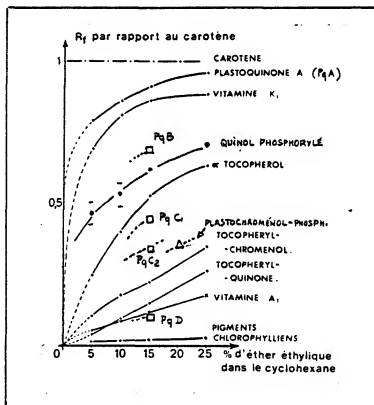
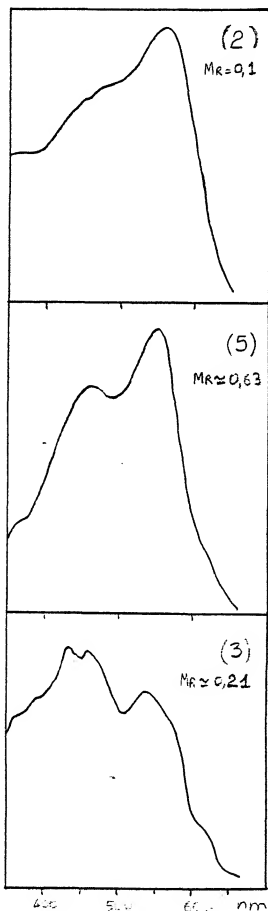


Fig. 25 Mobilités chromatographiques comparées
de différents Co-facteurs "photosynthétiques"
sur plaques de gel de silice K-301 V .
(BOUÑIAS, 1969, Chimie Analytique, 51, 76-82)

N-4



N-11

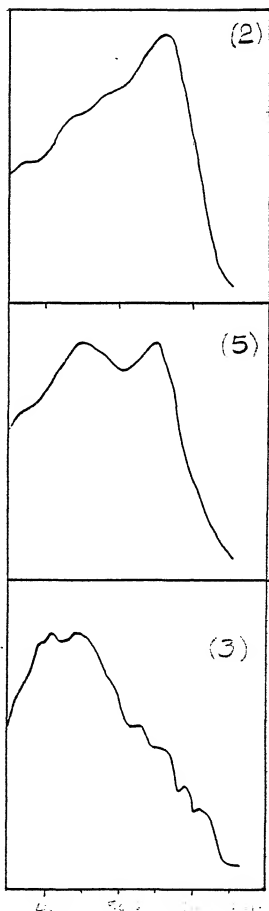


Fig. 26. Spectres d'absorption sur plaques K301V de quelques co-facteurs à identifier. (les N°s correspondent à la fig. 23).

Composé (5) Mobilité voisine de celle du quinol-phosphorylé. Spectre à deux maxima caractéristiques des chroménols - couleur similaire à celle de Chroménols-phosphorylés d'Arabidopsis. Hypothèse : chroménol-phosphorylé dérivé d'une plastoquinone (A ou B). Comme pour le composé (3), l'indice de cyclisation est plus accentué dans l'échantillon E-4, le plus rapproché du phénomène ($\lambda_{550}/\lambda_{450}$ varie de 1 à 1,25).

Les résultats numériques présentés dans le tableau ci-dessous sont exprimés en unités d'intégration (mm^2 , Ech. DO. 10 \rightarrow 0,5) par mg de poids frais - (Réf. 81-08)

Tableau 15

Composés - types

| | Jeunes feuilles | | Feuilles âgées | |
|-----------------------|---------------------|---------------------|----------------|----------------|
| | E-15 | E-8 | E-11 | E-4 |
| Tocophéryl-quinone | $29 \pm 0,4^*$ | $43 \pm 3^*$ | 2,8 | 3,0 |
| Tocophéryl-chroménol | $11,8 \pm 2,8^*$ | $8,2 \pm 1,2^*$ | 3,0 | 2,7 |
| chroménol phosphorylé | $58,9 \pm 2,3^{**}$ | $70,6 \pm 2,7^{**}$ | $193 \pm 1^*$ | $244 \pm 19^*$ |
| vitamine K | 7,7 | 3,4 | - | - |
| Plastoquinone A | 6,0 | 8,6 | - | - |
| β carotène | 43,5 | 33,0 | 46,2 | 20,0 |
| Plastochroménol "A" | 13,8 | 8,0 | 10,0 | 16,5 |
| Dérivé vitam. A | $\leq 14,5$ | 25 | 100 | 150 |

(* N = 2 mesures) (** N = 4 mesures)

Au voisinage du "phénomène" (E-8 et E-4) les quinones (sauf la vit. K) tendent à s'accumuler, ainsi que le chroménol-phosphorylé. Les variations des autres chroménols ne sont pas significatives. Le dérivé correspondant à la vitamine A s'accumule manifestement dans les feuilles âgées, mais davantage dans les échantillons prélevés sur la trace (E-4 et E-8).

Résultats portant sur la 2^e série.

Dans cette série, les principaux constituants se retrouvent présents. Le composé n°2 (dérivé-vitam. A) n'existe que dans l'extrait N-1. Dans les autres ne subsiste qu'une substance verte dont le spectre d'absorption rappelle celui de la Chl. A dans la bande de SORET (λ 425 nm) mais dont le pic dans le rouge est décalé à 685 nm. (fig. 27A). Il s'agit vraisemblablement de la phéophytine A dont la coloration a été "éclaircie" et avivée par le "greffage" d'un radical à base d'antimoine. Dans l'extrait N-1, le pic rouge reste à 670 nm.

D'autre part, le spectre du composé n°3 conserve dans tous les cas des caractéristiques le rapprochant des quimonos sans manifestation de tendances à la cyclisation (fig 27B). (Les dentelures proviennent du "vieillessement" sur plaque après révélation).

En dépit des difficultés d'interprétation déjà mentionnées plus haut, les principaux composants ont été identifiés, à l'exception d'un produit supplémentaire de mobilité légèrement inférieure à celle du chroménol-phosphorylé mais très nettement supérieure à celle de l' α -tocophérol. L'identification de ce composé, désigné par (5'), ne peut donner lieu, pour l'instant, à aucune hypothèse fondée.

Les résultats numériques sont groupés dans le tableau suivant.
(Tableau 16)

Tableau 16

| | E-1 | E-2 | E-3 | E-4 | E-5 | E-6 |
|-------------------|------------|-----|-----|------|-----|-----|
| Dérivé vit. A | 44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tocoph. quinone | 32 | 21 | 17 | 10,6 | 8,7 | 6,6 |
| Tocoph. chroménol | 14,4 ± 1,2 | 4,8 | 4,3 | 1,8 | 1,7 | 0,8 |
| Chroménol-2 | 71,5 | 5,7 | 3,7 | 0,8 | 0,6 | 0,2 |
| Dérivé 5' | 14,9 | 6 | 3,3 | 14 | 6,7 | 5,0 |

S'agissant ici de jeunes feuilles, le dérivé correspondant à la vitamine A est partout absent, sauf dans l'extrait E-1, ce qui confirme les résultats de la 1^{ère} série, mais "recule" l'observation au centre de la trace : dans l'effet retardé, rien ne subsiste en bordure.

Les chroménols sont dominants dans l'extrait 1, principalement le chroménol-phosphorylé, de même que la quinone du tocophérol. Les variations du composé 5' ne sont pas interprétables.

Comme pour les chlorophylles et caroténoïdes, des relations quantitatives apparaissent entre les distances et les concentrations, dans le cas de la tocophéryl quinone (Tq) du tocophéryl chroménol (Tc) et du chroménol-phosphorylé (CP). Les courbes, illustrées sur la fig. 28, ont été analysées en coordonnées bi-logarithmiques par le calcul de régression linéaire sur $D = (1+d)$.

Les résultats sont résumés ci-dessous ($N = 6$ couples de données)

Tableau 17

| Variables : | | | |
|------------------|-----------|-----------|-----------|
| { aléatoire : | $LN(Tq)$ | $LN(Tc)$ | $LN(C-P)$ |
| { contrôlée : | $LN(1+d)$ | $LN(1+d)$ | $LN(1+d)$ |
| Corrélation | -0,973 | -0,951 | -0,961 |
| pente | -0,623 | -1,04 | -2,17 |
| Intersections/ox | 5,60 | 2,44 | 1,77 |
| /oy | 3,49 | 2,55 | 3,84 |
| P(p) | 0,00054 | 0,0018 | 0,0011 |

Les pentes traduisent la cinétique de décroissance des concentrations en fonction de l'éloignement du phénomène : elles croissent dans le sens : quinone \rightarrow chroménol \rightarrow chroménol-P.

Observons que ces équations rappellent celles qui relient la proportion de $PhA'/Chl.A$ à la distance (fig. 11 E) : la pente bilogarithmique était alors : $b = -1,06$ (comme pour Tc).

Les Chroménols sont des formes inactives par rapport aux quinones, de même que les Chroménol-P par rapport aux Quinols-P : la phéophytine est elle-même une forme inactive de la chlorophylle (physiologiquement parlant).

CONCLUSION PROVISOIRE

Le voisinage du Phénomène paraît donc, en définitive, favoriser l'accumulation de dérivés métaboliques inactifs, altérés par oxydations (chlorophylles) ou caractéristiques d'une sénescence biochimique paradoxale chez des feuilles morphologiquement "jeunes".

Les modifications liées au "phénomène" sont soit quantitatives (fonctions de l'éloignement) soit qualitatives (modifications de structures dans les extraits E-1, perceptibles par spectrophotométrie).

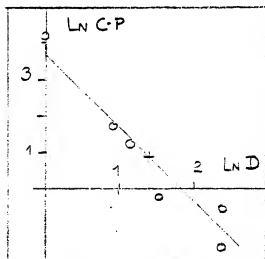
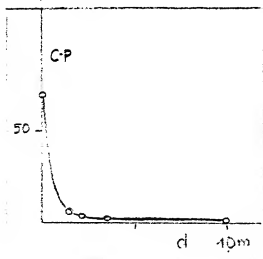
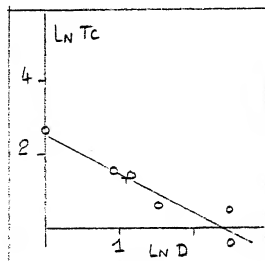
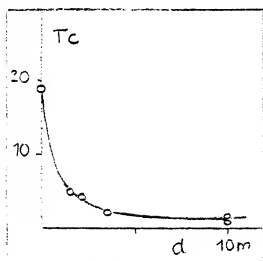
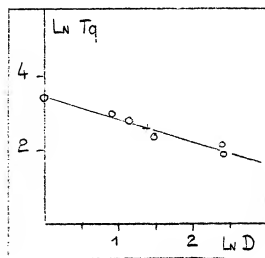
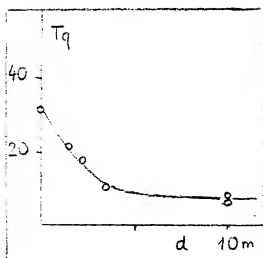


fig.28. Variations des concentrations en tocophéryl quinone (Tq), tocophéryl chroménol (Tc) et chroménol-phosphorylé (CP) en fonction de la distance d au "centre du phénomène": coordonnées naturelles et bi logarithmiques. $D = (1+d)$.